10 月 October
2020，63(10)：1268 – 1275

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi：10.16380/j.kcxb.2020.10.012

昆虫着色及体表黑色斑纹和斑点形成机制研究进展

高　云[#]，梁燕婷[#]，留怡勤，徐豫松，王华兵[*]

（浙江大学动物科学学院，杭州 310058）

摘要：昆虫在生长发育的过程中，会不断受到捕食者的攻击，为逃避被捕食在长期的适应进化中展现出各种适应性的形态特征，体色和斑纹的适应性变化是其中重要的防御策略。昆虫多样的着色模式常用于释放警告信号或者模仿宿主植物，避免被其他动物捕食并且加速逃避学习，而且在寻求伴侣、适应地理、调节体温和抵抗紫外线等方面发挥重要的生物功能，是昆虫学研究的热点之一。鳞翅目昆虫具有分布广、种类多的特点，大量的斑点和斑纹模式常见于鳞翅目昆虫中，其生物学功能比其他动物更明显。近年来研究发现色素色和结构色是昆虫主要的着色模式，眼色素、黑色素以及喋啶类色素是影响昆虫着色最重要的色素；而昆虫的寄主、环境因素、激素显著影响昆虫多样性着色模式的形成。利用定位克隆、经典遗传连锁图谱、RNA 干涉、基因组编辑、高通量测序等技术分离鉴定出了多个调控鳞翅目昆虫着色的关键基因。研究表明，*TH*，*DDC*，*yellow*，*laccase2*，*ebony*，*AA-NAT*，*tan* 和 *GTPCHI* 是昆虫色素合成信号通路中的关键基因，而多效性基因 *spz3*，*apt-like* 和 *wnt1* 以及 20E 诱导的转录因子 *E75A* 和 *spalt* 通过影响鳞翅目昆虫黑色素合成信号通路的活性从而调控黑色素的合成与沉积。本文对昆虫体色和斑纹多样性的形成和影响因素，昆虫着色类型及物质基础，以及黑色斑点和斑纹形成和调节机制方面的研究进展作了整理和总结，以期为今后着色基因的利用以及害虫防治提供理论参考。

关键词：鳞翅目；体色；着色模式；色素合成；基因编辑；RNAi

中图分类号：S435.132　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2020)10-1268-08

Research progress in pigmentation and the formation mechanisms of black stripes and spots on the body in insects

GAO Yun[#], LIANG Yan-Ting[#], LIU Yi-Qin, XU Yu-Song, WANG Hua-Bing[*] (College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Insects are constantly attacked by predators and exhibit adaptive traits for defense against predators during their growth and development. One of the defense strategies is an adaptive stripe pattern. The various coloration patterns of insects represent warning signals or mimic host plants to escape detection by predators and hasten avoidance learning. Furthermore, insect pigmentation patterns play important roles in such processes as mate preference, geographical adaptation, thermoregulation, and ultraviolet resistance. Thus, multifarious pigmentation patterns are highly researched. Lepidopteran insects include multiple species that are widely distributed. The adaptive stripe pattern is often observed in lepidopteran insects; thus, its biological roles are more evident than those in other insects. Recent research suggests that pigmentary color and schemochrome are the main determinants of insect color

基金项目：国家自然科学基金项目(31970460，31572321)；浙江省自然科学基金项目(LY17C170002)

作者简介：高云，女，1994 年 4 月生，山东泰安人，硕士研究生，研究方向为鳞翅目昆虫进化与生物反应器，E-mail：21717034@zju.edu.cn；梁燕婷，女，1994 年 2 月生，福建泉州人，博士研究生，研究方向为鳞翅目昆虫适应性进化，E-mail：liangyt@zju.edu.cn

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail：wanghb@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2020-02-24；接受日期 Accepted：2020-04-03

patterns, and ommochromes, melanin, and peridines significantly influence visual color patterns. In addition, hosts, environmental factors, and hormones are also thought to dramatically affect the diversity of color patterns in insects. In recent years, many genes that are crucial to pigmentation have been identified through positional cloning strategies, classical linkage maps, RNA interference, and high-throughput sequencing technologies combined with genome editing techniques. Recent studies suggest that *TH*, *DDC*, *yellow*, *laccase*2, *ebony*, *AA-NAT*, *tan*, and *GTPCHI* all play key roles in pigment synthesis. Furthermore, the pleiotropic genes *spz*3, *apt-like*, and *wnt*1 as well as the 20E-inducible transcription factors *E75A* and *spalt* target the melanin synthesis pathway, affecting the synthesis and deposition of melanin. In this article, we reviewed the progress in the research of the formation and influencing factors of the diversity of insect body color and markings, the type and material basis of insect coloration, and the regulation of black spots and markings on insects, hoping to provide a theoretical basis for the utilization of pigmentation-related genes and new insights for pest control.

Key words: Lepidoptera; body color; pigmentation pattern; pigment synthesis; gene editing; RNAi

昆虫是地球上数量最多的动物群体,现已发现100 多万种,形态各异的昆虫几乎遍布世界的每一个角落。昆虫的广泛分布与其多样性的体色和斑纹有着密切的联系。昆虫的体色和斑纹在生态和行为方面具有重要作用,有利于躲避敌害或适应环境变化,是生物进化和自然选择的结果。

昆虫模拟、伪装成周边的环境所形成的拟态色对自身保护有利,由明暗颜色的对比或者鲜艳明亮的色彩形成的警戒色用来警告捕食者自身有毒或不可食,这些方法是昆虫成功欺骗捕食者的有效生存策略(Tullberg *et al*., 2005; Janzen *et al*., 2010; Dasmahapatra *et al*., 2012)。此外,昆虫体色和斑纹还具有寻求伴侣、适应地理、调节体温、抵抗紫外线等重要的生理功能,从而使昆虫在残酷的自然选择中存活下来,因此昆虫体色和斑纹是进化选择的重要靶标之一(Wittkopp *et al*., 2003, 2009; Kronforst *et al*., 2006, 2012; Takahashi, 2013; 彭晨星等, 2016)。

昆虫体色和斑纹多型现象在昆虫第二大目——鳞翅目(Lepidoptera)昆虫中尤其显著。这种多样性不仅存在于不同的物种中,在相近物种甚至同一物种不同的品系间、同一品系处在不同环境或不同发育时期的个体间也会呈现显著差异,仅家蚕 *Bombyx mori* 就有 200 多种与着色相关的突变体,比如:家蚕 N4 品系表皮有 3 种斑纹,分别为第 2 胸节眼点区域、第 2 腹节的半月纹和第 5 腹节的星斑纹,然而家蚕自发突变体 *Zebra*(*Ze*)每个腹节前端都有黑色斑纹,足点处有黑点(KonDo *et al*., 2017)。凤蝶属中的大多数物种在幼体发育期间会显著改变其体色模式,并且这些变化是固定且不可逆的(Prudic *et al*., 2007)。柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* 1 –4 龄幼虫体表呈现模仿鸟粪的黑色和棕色的斑纹图案,在末龄幼虫期,它们的着色模式又切换为绿色(Tullberg *et al*., 2005; Jin *et al*., 2019)。研究者利用家蚕和柑橘凤蝶的着色突变体,通过定位克隆、连锁分析和遗传图谱解析了导致色素沉积差异的基因,但是体色和斑纹模式的形成和调节机制至今仍不完全清楚。近年来,CRISPR/Cas9, RNAi 和体内电穿孔介导的基因组编辑技术快速发展,为分析着色的分子机制提供了重要工具。本文综述了昆虫体色和斑纹多样性的形成和影响因素,昆虫着色类型及物质基础,以及黑色斑点和斑纹的形成和调节机制方面的研究进展,希望通过相关研究的梳理,为今后的研究提供借鉴。

1　昆虫体色和斑纹多样性的形成和影响因素

目前昆虫体色和斑纹多样性形成和影响因素的主要假说有寄主专化论、环境因素控制论、基因控制论和激素控制论等。

1.1　寄主专化论

许多昆虫因其寄主植物不同而呈现出不同颜色。棉蚜 *Aphis gossypii* 是世界性的重要害虫,多食性的棉蚜在长期取食和进化过程中已分化形成不同的寄主专化型。对棉花型和黄瓜型两种专化型棉蚜寄主的选择行为试验结果表明,棉花型棉蚜对棉花的选择性明显高于对黄瓜的选择性,黄瓜型棉蚜对黄瓜的选择性明显高于对棉花的选择性(王丽, 2015)。寄主植物对瓜蚜无翅胎生雌蚜的体色具有明显影响,取食笋瓜、南瓜、瓤子、黄瓜和冬瓜的瓜蚜

体色各不相同,依次逐渐变深(王健等, 1996)。

1.2 环境因素控制论

影响昆虫体色的环境因素有温度、湿度、种群密度以及背景颜色等,昆虫种类不同,环境因素对体色的影响也存在差异。

1.2.1 温度:黑带食蚜蝇 *Episyrphus balteatus* 成虫腹部体色则主要受蛹期发育温度的影响:温度降低导致蛹期延长,会产生大量的暗色个体(霍科科和张宏杰, 2004)。当蚜虫在不同的恒温条件下饲养时,成虫的表皮着色表现出显著差异,24℃恒温条件下饲养的雌性成虫,头部为橙棕色,而中胸部呈现橙色;然而在12℃条件下饲养的成虫的头部和中胸部是黑色的(Liu and Carver, 1982)。

1.2.2 湿度:生活在高湿度环境中的飞蝗 *Locusta migratoria* 若虫体色为绿色,而低湿度环境中的若虫个体呈褐色、黄色或浅灰色。变温性果蝇 *Drosophila jambulina* 随着湿度的变化呈现多样的体色,而且体色的特异性分化是对湿热环境的适应(Khasa *et al.*, 2013)。

1.2.3 种群密度:群居型飞蝗 *L. migratoria* 的个体呈现黑色背板和棕色腹面,散居型个体体色一般为均匀的绿色,群居型的黑色体色是在散居型绿色基础上增加红色形成的(Yang *et al.*, 2019)。斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 2-3 龄幼虫由高密度饲养转移至单独饲养时,终龄期幼虫的黑化程度显著降低(孔海龙等, 2011)。

1.2.4 背景颜色:19 世纪中叶之前的桦尺蠖 *Biston betularia* 呈浅灰色,工业革命以后,生活在工业污染区的桦尺蠖颜色变暗,而正常环境下的桦尺蠖仍呈浅色。利用计算机视觉研究食物颜色对不同日龄昆虫体色的影响,发现斜纹夜蛾幼虫体色受食物颜色影响,且在1-7日龄最为显著,这是因为食物颜色对斜纹夜蛾体色影响是一个积累的过程(彭云鹏等, 2015)。

1.3 基因控制论

随着分子生物学和高通量测序技术的发展,越来越多的研究结果表明体色是由遗传基因控制的。目前已经鉴定出大量控制果蝇、家蚕和柑橘凤蝶体色和斑纹的基因。例如,雄性果蝇的特异性翅色素沉着与 *yellow* 基因的顺式调控元件的修饰有关(Gompel *et al.*, 2005);转录因子 *Apontic-like* (*apt-like*)能够调控家蚕幼虫呈现不同的斑点和斑纹模式(Yoda, 2015)。

1.4 激素控制论

激素对昆虫的蜕皮、滞育等生长发育过程具有重要调节功能,在体色变异中发挥的作用也得到广泛的研究。斜纹夜蛾体色多样性由黑化激素和保幼激素(juvenile hormone, JH)共同调控:高浓度的 JH 抑制黑化激素的分泌,当 JH 浓度降低时,黑化激素滴度增加,终龄幼虫的体色变为黑色。烟草天蛾 *Manduca sexta* 的表皮黑化由保幼激素和蜕皮激素(ecdysone)共同调控。眠期两种激素的滴度发生显著变化,眠后期蜕皮激素滴度下降,黑色素合成信号通路基因的转录水平显著提高,黑色素合成信号通路被激活(Hirumaand and Riddiford, 2009)。

综上所述,基因、激素和各种环境条件相互协调共同影响昆虫的体色,基因控制在其中发挥决定性的作用,而其具体的协调和调控机制,尤其是在激素和基因水平上的协调和调控机制大多仍然未知。

2 昆虫着色类型及物质基础

根据颜色产生的原因,昆虫着色类型可以分为色素色和结构色。色素色是基于生理代谢产生的,是昆虫着色的重要形式。代谢物沉积在昆虫体壁,吸收某种波长的光,反射其他可见光,形成特定的颜色。结构色是昆虫体壁的鳞片或者蜡质等超微结构,使光波发生衍射、干涉或者折射产生的颜色。

昆虫体内不同类型色素物质的合成和代谢是产生多样性体色模式的重要物质基础,其中眼色素(ommochromes)、黑色素(melanin)、喋啶类色素(peridines)是影响昆虫着色最重要的色素。此外,在鳞翅目模式生物家蚕的生长发育过程中,除了上述 3 类着色物质,尿酸(uric acid)、类胡萝卜素(carotenoids)和黄酮类色素(flavonoids)等色素物质也发挥了重要作用。据研究,眼色素影响家蚕的卵色和成虫复眼的颜色,黑色素、蝶啶类色素、眼黄素、眼色素和尿酸共同影响家蚕幼虫体壁着色,茧丝中黄酮类色素与类胡萝卜素的比例决定茧色。

3 着色相关通路基因功能分析的新方法

通过经典遗传连锁图谱、基因组数据,结合定位克隆策略,研究人员已经鉴定出许多昆虫着色相关的候选基因。近年来,日益成熟的基因编辑技术,为深入研究着色分子机制提供了实验基础。基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑技术,可在特定时间诱导基因组或者转录产物发生双链断裂,进行定点修饰、定向敲除或插入目的基因等精确修饰,从而特异性改变遗传物质。目前的 CRISPR/Cas9 技术通常

以人工设计的小向导 RNA（small guide RNA，sgRNA）替换 tracrRNA：crRNA 复合物，通过非同源末端连接（non-homologous end joining，NHEJ）和同源定向修复（homologous directed repair，HDR）高效地删除、插入和激活各种组织细胞中的基因，在哺乳动物人类、食蟹猴，脊椎动物斑马鱼，无脊椎动物昆虫以及细菌等多种生物中已经得到广泛应用（Doudna and Charpentier，2014；Niu *et al.*，2014；周金伟等，2015；Kang *et al.*，2016；Tang *et al.*，2017；Zhang *et al.*，2019）。但是利用 CRISPR/Cas9 系统进行基因编辑仍然存在一些问题，例如：存在脱靶效应、筛选纯合体的周期比较长、敲除致死现象。为了快速地分析相关基因的功能以及发挥作用的分子机制，科研工作者一直在开发新的基因编辑工具。电穿孔介导的 RNAi 技术具有特异性强、重复利用性好以及高效持久的特点，可将目标基因的 dsRNA 或质粒 DNA 有效地导入靶组织（如表皮）中，研究靶基因的表达对表皮斑纹的影响，已成为探索斑纹形成相关基因功能的高效工具（Yoda，2015；KonDo *et al.*，2017）。

4 昆虫体表黑色斑纹和斑点的形成和调节机制

昆虫幼虫的体色和斑纹模式主要取决于表皮细胞和表皮中色素的性质和分布。与成虫相比，幼虫在每次蜕皮期都会重复色素沉着过程，同时受环境的影响较大，使得幼虫斑纹和体色发生突变的几率增加，从而呈现多样的色素沉积模式。在自然界中，黑化是生物体体色发生变异最为显著和普遍的现象，同时也是产生昆虫体色多样性非常重要的着色模式。黑化过程中黑色素（melanin）是体色和斑纹多样性形成过程中至关重要的色素，它不仅参与昆虫红色、深绿色和黑色等颜色斑纹的形成，它的前体物质多巴（dopa）和多巴胺（dopamine）还与昆虫免疫、表皮硬化等生理过程有密切的联系（弓慧琼等，2018）。在昆虫中，鳞翅目昆虫体色和斑纹多型现象尤其显著，可作为出色的模型系统用于研究颜色模式的形成与调节机制，目前已经鉴定出大量参与或调控黑色素合成的基因（表 1）。

表 1 已知黑色素合成信号通路基因的功能

Table 1 Functions of the known genes of melanin synthesis pathway

物种 Species	基因 Genes	基因功能 Function of genes	参考文献 References
家蚕 *Bombyx mori*	*TH*	将酪氨酸转化为多巴 Convert tyrosine into dopa	Liu *et al.*, 2010
	DDC	将多巴转化为多巴胺 Convert dopa into dopamine	Hiruma and Riddiford, 2009
	yellow, *laccase2*	将多巴或者多巴胺转化为黑色素 Convert dopa/dopamine into melanin	Ito *et al.*, 2010
	ebony	抑制黑色素形成 Inhibit the formation of melanin	Futahashi *et al.*, 2008
	AA-NAT	将多巴胺转化为 NADA Convert dopamine into NADA	Zhan *et al.*, 2010
	tan	将 NBAD 转化为多巴胺 Convert NBAD into dopamine	Futahashi *et al.*, 2010
柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*	*GTPCHI*	参与幼虫时期特异性的表皮斑点形成 Associated with stage-specific larval cuticular markings	Futahashi and Fujiwara, 2005

4.1 昆虫体表黑色斑纹和斑点形成机制

以四氢生物蝶呤（tetrahydrobiopterin，BH4）为辅因子，酪氨酸经过一系列生化反应生成各种色素前体物质如图 1 所示。其中，黑色素合成代谢通路是研究最广泛的色素合成通路，由 *TH* 基因编码的酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）将酪氨酸转化为二羟基苯丙氨酸[又称多巴（dopa）]，多巴由 *DDC* 编码的多巴脱羧酶（dopa decarboxylase，DDC）转化为多巴胺（dopamine），这些过程在表皮细胞中完成；*yellow* 家族基因和 *Lac*2 将多巴胺或者多巴转化为多巴胺黑色素或者多巴黑色素。因此多巴胺和多巴被认为是昆虫表皮黑色素最重要的前体物质（Futahashiand and Fujiwara，2005；Futahashi *et al.*，2008；Hiruma and Riddiford，2009；Liu *et al.*，2010）。合成的色素前体从表皮细胞中分泌出来，然后掺入表皮，形成可视化的黑色斑纹和斑点模式。除此以外，多巴胺还有两个代谢去向，其中一个去向是由 *ebony* 转化为 N-β-丙氨酰多巴胺（N-β-alanyl dopamine，NBAD），参与表皮鞣化，且使表皮呈现黄色或者淡黄色，这一过程可以被 *tan* 逆转（Futahashi *et al.*，2010；Li *et al.*，2015）。另一个去向涉及 N-乙酰基多巴胺（N-acetyl dopamine，NADA）的产生，NADA 参与表皮硬化，是无色硬化蛋白的前体，该过程取决于芳基烷基胺-N-乙酰基转移酶（arylalkylamine N-acetyltransferase，AA-NAT）的活性（Zhan *et al.*，2010）。根据时空表达谱，上述过程相关基因可以

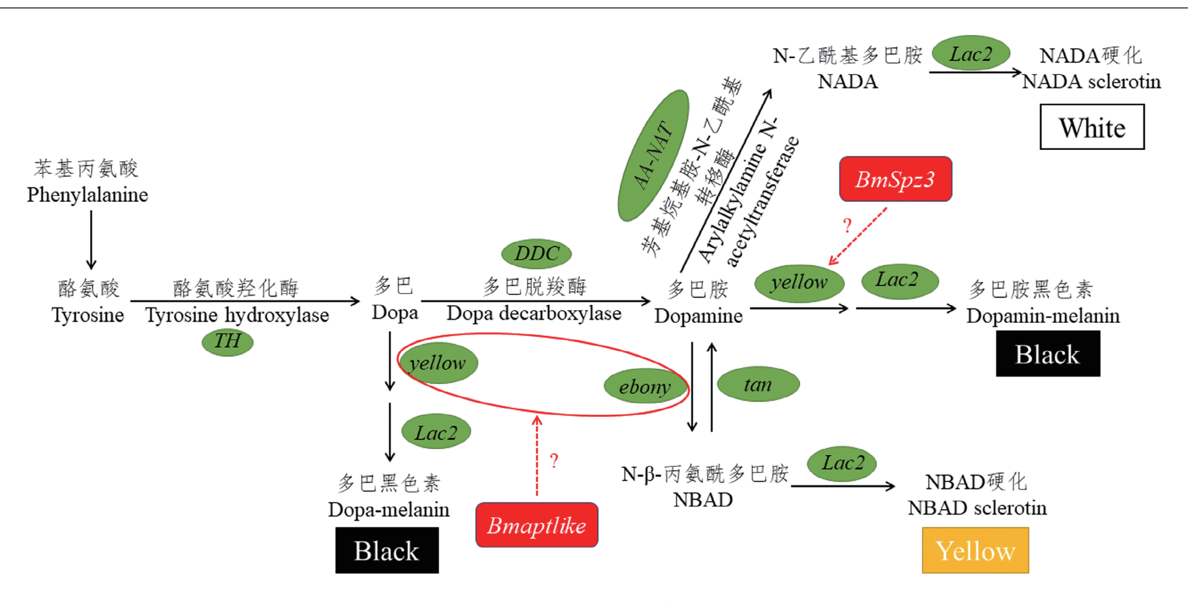


图 1 黑色素生物合成信号通路

Fig. 1 Melanin biosynthesis pathway

绿色椭圆框代表色素合成通路的关键基因，红色框代表调节因子，黑色、黄色和白色框代表色素前体沉积到表皮的颜色。The green oval boxes represent the key genes of the pigment synthesis pathway, the red boxes represent the regulator of the pathway, and the black, yellow and white boxes represent the color of the pigment precursor deposited on the epidermis.

分为 3 组：编码分泌的蛋白基因 *yellow* 和 *lac*2 特异性地在眠中期［头囊滑移(head capsule slippage)后约 4－8 h］表达；编码表皮黑色素合成酶的基因 *TH*, *DDC*, *ebony* 和 *tan* 在眠后期特异性地表达；*GTPCHI* 在整个蜕皮期中均有表达。用竞争性的 TH 抑制剂 3-碘酪氨酸(3-iodo-tyrosine, 3-IT)处理柑橘凤蝶可抑制幼虫表皮黑化(Futahashi and Fujiwara, 2005)；家蚕 *BmTH* 基因结构的改变，导致新生家蚕呈巧克力色，添食多巴可使其恢复黑色，而且恢复效果呈现剂量依赖性，这表明 TH 是表皮黑色化过程的关键酶(Liu *et al.*, 2010)。*mln* 突变体的幼虫头部和成虫比野生型沉积更多的黑色素，而且突变体头部和胸足多巴胺的含量是野生型的两倍多。通过定位克隆发现，突变体中编码芳基烷基胺-N-乙酰基转移酶的基因 *AA-NAT* 发生可变剪切，导致 AA-NAT 的酶活性消失，使得多巴胺大量积累，并且向着合成黑色素的方向代谢，在幼虫头部和成虫积累大量的黑色素(Dai *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2010)。这些研究表明色素合成通路中的酶以及底物等处于动态平衡的过程，通路中某一催化酶或者基因表达受到抑制时，会造成底物大量积累并且沿着其他色素合成方向进行反应。

4.2 昆虫体表黑色斑纹和斑点调节机制

通常情况下，昆虫在蜕皮期会积累大量的色素，而在此过程中，控制生长发育的保幼激素和滞育激素的滴度会发生剧烈的变化。研究证实，参与调控昆虫体色和斑纹多样性的基因的表达水平受蜕皮激素［主要活性物质 20-羟基蜕皮酮(20E)］和保幼激素共同调节(Hiruma and Riddiford, 2009)。柑橘凤蝶的斑纹模式在末龄幼虫期发生显著的变化，这种转变是由多种激素(蜕皮激素、保幼激素等)精确调控产生的，在 4 龄幼虫保幼激素敏感期(4 龄起蚕前 20 h)，柑橘凤蝶 5 龄幼虫的体色已被决定，这为研究激素对体色和斑纹多样性的调节机制提供了依据(Futahashi and Fujiwara, 2008; Jin *et al.*, 2019)。分析家蚕黑色素合成通路中的基因序列，发现 *yellow*, *lac*2, *TH*, *ebony* 和 *tan* 基因上游 5 kb 区域具有潜在的单体核受体结合元件 RGGTCA 序列，已知该序列可结合到 20E 诱导的转录因子 *E75A* 和 *HR*3；研究表明，*E75A* 和 *spalt* 在柑橘凤蝶眼点的黑色区域特异性表达(Futahashi *et al.*, 2012)。在果蝇中，研究人员发现性别决定因子(*doublesex*, *dsx*)，HOX 基因(*abdominal-B*, *Abd-B*)和无翅基因(*wingless*, *Wnt*)等参与调节成虫着色模式，在此基础上，研究者发现多种多效性的因子参与调控鳞翅目昆虫黑色素合成通路(表 2)。在家蚕中比较典型的是参与背腹轴形成和先天免疫的 Toll 信号通路，Toll-8 及其配体 spz3 可能通过 NF-κB 信号通路特异性地诱导黑色素合成通路基因 *yellow* 的表达，从而沉积大量的黑色素，导致家蚕 *Ze* 突变体背节前端都有黑色斑纹，足点处有黑点。*spalt* 和 *E75* 在柑橘凤蝶幼虫体表黑色素合成和眼点形成过程中发挥关键

表 2　已知调节黑色素合成信号通路的基因
Table 2　The known genes regulating melanin synthesis pathway

物种 Species	基因 Genes	参考文献 References
家蚕 *Bombyx mori*	*spz*3	KonDo *et al*., 2017
	apt-like	Yoda, 2015
	*wnt*1	Yamaguchi *et al*., 2013
柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*	*E75A*	Futahashi *et al*., 2012
	spalt	

作用(Futahashi *et al*., 2012)。

凤蝶属中大多数物种的体色模式在幼体发育期间会显着改变,这些变化是固定且不可逆的。例如,在柑橘凤蝶中,1 –4 龄幼虫体表都显示出黑色和棕色的颜色图案,并带有白色“V”形斑块,被认为是模仿鸟粪(模仿图案)。然而,在最后龄期,它们的着色模式切换为绿色,在第 3 胸节(T3)上有一对假眼点,在腹节的背侧上有深绿色的“V”形标记,这种模式被认为是一种高级的反捕食者适应措施,使其可以在一定距离内隐藏于寄主植物上,从而适应最后龄期可能发生的微生境和觅食行为的潜在变化(Futahashi and Fujiwara, 2008)。研究表明,柑橘凤蝶 5 龄幼虫的斑纹模式预形成过程是在 4 龄保幼激素敏感期决定的,为了筛选导致 5 龄幼虫颜色转变的基因,在 JH 敏感期的 20 h 内的 0, 6 和 12 h 3 个时间点,分别取 4 龄和 5 龄幼虫期颜色显著改变的 3 个区域的样品进行 RNA 测序分析;利用 9 个 RNA 文库,最终筛选到 20 个候选基因,并且对其中的 3 个转录因子(*cll*, *abd-A* 和 *Abd-B*)进行功能分析(Jin *et al*., 2019)。结果表明,在 3 龄幼虫眼点区域敲低 *cll*,4 龄时没有观察到明显的表型变化,然而 5 龄幼虫敲低 *cll* 一侧眼点的尺寸明显变小,而且眼点附近的红色区域变得不可分辨,周围的线条变得无序。当在“V”形标记周围敲低 *abd-A* 和 *Abd-B* 基因时,在 4 龄幼虫期同样没有发现明显的表型变化,但是在 5 龄幼虫期 *abd-A* 敲低的个体中,“V”形标记完全消失,仅观察到绿色的体色。相反,在 *Abd-B* 敲低的个体中,“V”形标志没有变化,仅出现一些异常的浅黑色区域。为了更加深入地研究 *Abd-B* 的功能,在 *Abd-B* 高表达的区域进行该基因的 RNA 干涉实验,发现两个“V”形标志之间出现了大的异常的黑化区域。结果表明这些基因在 JH 敏感期和在斑纹模式预形成基因网络控制中发挥重要作用(Jin *et al*., 2019)。

家蚕显性突变体 *Ze* 在每个背节的前缘都有一条黑色斑纹。对 3 135 个幼虫的精确连锁图谱分析揭示了负责 *Ze* 位点的 63 kb 区域,该区域包含 3 个候选基因,其中包括 Toll 配体基因 *spätzle*3(*spz*-3),研究发现只有 *spz*-3/*Toll*-8 参与黑色素化过程。同时,在 *Ze* 突变体的斑纹区域,*yellow* 基因显著上调,说明 *spz*3 通过影响 *yellow* 基因的表达从而影响黑色素合成信号通路的活性。这项研究为 Toll 信号通路控制家蚕的黑化过程和适应性斑纹模式的形成提供了直接的证据(KonDo *et al*., 2017)。

5　小结与展望

昆虫体色和斑纹多样性是研究发育生物学、自然选择和形态性状进化的良好对象。生化和遗传研究表明,许多化学物质和色素合成通路参与体色的形成,其复杂的形成机制和精确的调控机制一直吸引着众多研究者的目光。通过对昆虫发育过程的研究,揭示在其进化过程中获得体色和斑纹的多态性形成机制。包括利用家蚕不同时期发生色素沉着,来研究着色模式形成的机制;通过果蝇成虫种内和种间腹部着色的差异,来研究色素沉积模式多样性的机制;利用柑橘凤蝶幼虫斑纹模式的改变,探索色素合成和沉积多样性的调节机制。但是这些研究结果还不足以使我们完全理解昆虫体色和斑纹模式形成和调节的机制。在鳞翅目昆虫中,家蚕和柑橘凤蝶因具有诸多色素沉着品系,以及完善的全基因组序列结果和高质量连锁图谱,结合成熟的基因编辑技术,非常适合作为鉴定体色和斑纹模式形成的分子机制的物种,鉴定出来大量与色素合成相关的基因,为探究昆虫表型的趋同和趋异进化的基础提供了大量的理论依据。例如,编码转录因子保守基因 *apt-like* 构成了家蚕 *p* 基因座,导致至少 15 种不同的幼虫斑纹模式。*apt-like* 和黑色素合成基因的表达量在斑纹突变体 *Striped* 和正常突变体(*p*)的黑色区域显著上调,但在无斑纹突变体 *p* 中不表达。此外,家蚕黑色素前体物质多巴和多巴胺还与昆虫免疫等生理过程有密切的联系。当昆虫被细菌或真菌感染时,体内不仅通过 Spz 和 Toll 信号通路诱导抗菌肽的表达,还会通过前酚氧化酶通路产生黑化(Takahashi *et al*., 2015; Wang and Jiang, 2017)。尽管 NF-κB 因子在幼虫色素沉着中的作用尚不清楚,但是 Toll 通路确实参与黑色素形成(KonDo *et al*., 2017)。值得注意的是,Lac-2 参与家蚕幼虫色素沉着,而酚氧化酶参与先天免疫的黑化过程,尽管两者

在结构上是不同的,但是显示相同的酶活性。因此,有关幼虫色素沉着和先天免疫的其他比较研究可能会揭示黑色素合成更加精确的信号通路,同时有助于解析昆虫免疫信号的网络。

此外,随着对鳞翅目昆虫着色的分子机制的深入研究,更多的疑问也随之产生。例如,色素合成相关的基因在不同物种中发挥的作用是否相同呢? 与柑橘凤蝶色素合成相关的基因以时期特异性的模式发挥作用,而果蝇的成年腹部标记被相关基因以标记特异性方式调控。成虫果蝇腹部黑色斑点的色素分布主要受 *yellow* 和 *tan* 的调控;柑橘凤蝶和家蚕的时期特异性的斑点形成需要 *TH* 和 *DDC* 的共表达,但是 *TH* 和 *DDC* 在果蝇中几乎不发挥功能;此外,*ebony* 和 *tan* 的表达也具有物种差异性。即使同属鳞翅目,相同基因发挥的功能也有差异,比如 *GTPCHI* 和柑橘凤蝶幼虫表皮斑纹的形成有关,而在家蚕中没有发现类似功能。分析色素合成的调控机制发现,保幼激素和蜕皮激素及其下游的转录因子在鳞翅目昆虫着色过程中发挥重要作用;*HOX* 基因 *Abd-B* 和色素合成基因共同作用,影响果蝇种间和种内的体色和斑纹模式(Jeong *et al*., 2006);柑橘凤蝶 5 龄幼虫期着色模式的改变除受 *Abd-B* 的调控以外,还受同属 *HOX* 基因的 *clawless* 和 *abdominal-A* 的影响。这些结果说明果蝇与鳞翅目昆虫着色形成和调节机制相似,但是不完全相同。相信随着鳞翅目昆虫众多体色和斑纹形成机制的解析,昆虫色素调控网络也会取得更多突破。

参考文献 (References)

Dai FY, Qiao L, Tong XL, Cao C, Chen P, Chen J, Lu C, Xiang ZH, 2010. Mutations of an arylalkylamine-N-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant. *J. Biol. Chem*., 285(25): 19553 – 19560.

Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey JW, Whibley A, Nadeau NJ, Zimin AV, Hughes DST, Ferguson LC, Martin SH, 2012. Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487(7405): 94 – 98.

Doudna JA, Charpentier E, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213): 1258096.

Futahashi R, Banno Y, Fujiwara H, 2010. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene prepatterning process: new evidence from *tan* and *laccase*2. *Evol. Dev*., 12(2): 157 – 167.

Futahashi R, Fujiwara H, 2005. Melanin-synthesis enzymes coregulate stage-specific larval cuticular markings in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Dev. Genes. Evol*., 215(10): 519 – 529.

Futahashi R, Fujiwara H, 2008. Juvenile hormone regulates butterfly larval pattern switches. *Science*, 319(5866): 1061 – 1064.

Futahashi R, Sato J, Meng Y, Okamoto S, Daimon T, Yamamoto K, Suetsugu Y, Narukawa J, Takahashi H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Fujiwara H, 2008. *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the larval color mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 180(4): 1995 – 2005.

Futahashi R, Shirataki H, Narita T, Mita K, Fujiwara H, 2012. Comprehensive microarray-based analysis for stage-specific larval camouflage pattern-associated genes in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *BMC Biol*., 10(1): 46 – 49.

Gompel N, Prud'homme B, Wittkopp PJ, Kassner VA, Carroll SB, 2005. Chance caught on the wing: *cis*-regulatory evolution and the origin of pigment patterns in *Drosophila*. *Nature*, 433 (7025): 481 – 487.

Gong HQ, Zhao XM, Guo DL, Ma EB, Zhang JZ, 2018. Progress in research on insect bursicon and its receptor. *Chin. J. Appl. Entomol*., 55(3): 317 – 328. [弓慧琼, 赵小明, 郭东龙, 马恩波, 张建珍, 2018. 昆虫鞣化激素及其受体研究进展. 应用昆虫学报, 55(3): 317 – 328]

Hiruma K, Riddiford LM, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 39(4): 245 – 253.

Huo KK, Zhang HJ, 2004. Research process of variation in body color of Syrphidae. *J. Hanzhong Teach. Coll*. (*Nat. Sci*.), 22(2): 60 – 66. [霍科科, 张宏杰, 2004. 食蚜蝇科昆虫体色变异的研究进展. 汉中师范学院学报(自然科学), 22(2): 60 – 66]

Ito K, Katsuma S, Yamamoto K, Kadono-Okuda K, Mita K, Shimada T, 2010. Yellow-e determines the color pattern of larval head and tail spots of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem*., 285(8): 5624 – 5629.

Janzen DH, Hallwachs W, Burns JM, 2010. A tropical horde of counterfeit predator eyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(26): 11659 – 11665.

Jeong SY, Rokas A, Carroll SB, 2006. Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell*, 125(7): 1387 – 1399.

Jin H, Seki T, Yamaguchi J, Fujiwara H, 2019. Prepatterning of *Papilio xuthus* caterpillar camouflage is controlled by three homeobox genes: *clawless*, *abdominal-A*, and *Abdominal-B*. *Sci. Adv*., 5 (4): eaav7569.

Kang XJ, He WY, Huang YL, Yu Q, Chen YY, Gao XC, Sun XF, Fan Y, 2016. Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J. Assist. Reprod. Genet*., 33(5): 581 – 588.

Khasa E, Badhwar P, Bhan V, 2013. Seasonal changes in humidity level in the tropics impact body color polymorphism and water balance in *Drosophila jambulina*. *Acta Entomol. Sin*., 56(12): 1367 – 1380.

KonDo Y, Yoda S, Mizoguchi T, Ando T, Yamaguchi J, Yamamoto K, Banno Y, Fujiwara H, 2017. Toll ligand Spätzle3 controls melanization in the stripe pattern formation in caterpillars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(31): 8336 – 8341.

Kong HL, Luo LZ, Jiang XF, Zhang L, Hu Y, 2011. Effects of larval density on growth, development and reproduction of the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta*

Entomol. Sin., 54(12): 52 –58. ［孔海龙, 罗礼智, 江幸福, 张蕾, 胡毅, 2011. 幼虫密度对草地螟生长发育及繁殖的影响. 昆虫学报, 54(12): 52 –58］

Kronforst MR, Barsh GS, Kopp A, Mallet J, Monteiro A, Mullen SP, Protas M, Rosenblum EB, Schneider CJ, Hoekstra HE, 2012. Unraveling the thread of nature's tapestry: the genetics of diversity and convergence in animal pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 25(4): 411 –433.

Kronforst MR, Young LG, Kapan DD, McNeely C, O'Neill RJ, Gilbert LE, 2006. Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(17): 6575 –6580.

Li XY, Fan DD, Zhang W, Liu GC, Zhang L, Zhao L, Fang XD, Chen L, Dong Y, Chen Y, Ding Y, Zhao RP, Feng MJ, Zhu YB, Feng Y, Jiang XT, Zhu DY, Xiang H, Feng XK, Li SC, Wang J, Zhang GJ, Kronforst MR, Wang W, 2015. Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. *Nat. Commun.*, 6: 8212 –8218.

Liu C, Yamamoto K, Cheng TC, Okuda KK, Narukawa J, Liu SP, Han Y, Futahashi R, Kidokoro K, Noda H, Kobayashi I, Tamura T, Ohnuma A, Banno Y, Dai FY, Xiang ZH, Goldsmith MR, Mita K, Xia QY, 2010. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(29): 12980 –12985.

Liu SS, Carver M, 1982. The effect of temperature on the adult integumental coloration of *Aphidius smithi*. *Entomol. Exp. Appl.*, 32(1): 54 –60.

Niu YY, Shen B, Cui YQ, Chen YC, Wang JY, Wang L, Kang Y, Zhao XY, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou JK, Guo XJ, Bi Y, Si CY, Hu B, Dong GY, Wang H, Zhou ZM, Li TQ, Tan T, Pu XQ, Wang F, Ji SH, Zhou Q, Huang XX, Ji WZ, Sha JH, 2014. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4): 836 –843.

Peng CX, Wu SY, Dai FY, 2016. Progress of molecular genetic studies on pigmentation pattern in silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Seric.*, 42(3): 373 –385. ［彭晨星, 吴松原, 代方银, 2016. 家蚕着色模式相关的分子遗传学研究. 蚕业科学, 42(3): 373 –385］

Peng YP, Wen LZ, Yi Q, Hu L, 2015. Quantitative analysis of body color change of *Prodenia litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in relation to food color using computer vision technology. *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 559 –568. ［彭云鹏, 文礼章, 易倩, 胡亮, 2015. 利用计算机视觉技术量化解析食物颜色与斜纹夜蛾幼虫体色变化的关系. 昆虫学报, 58(5): 559 –568］

Prudic KL, Oliver JC, Sperling FAH, 2007. The signal environment is more important than diet or chemical specialization in the evolution of warning coloration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(49): 19381 –19386.

Takahashi A, 2013. Pigmentation and behavior: potential association through pleiotropic genes in *Drosophila*. *Genes. Genet. Syst.*, 88(3): 165 –174.

Takahashi D, Garcia BL, Kanost MR, 2015. Initiating protease with modular domains interacts with β-glucan recognition protein to trigger innate immune response in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(45): 13856 –13861.

Tang LC, Zeng YT, Du HZ, Gong MM, Peng J, Zhang BX, Lei M, Zhao F, Wang WH, Li XW, Liu JQ, 2017. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol. Genet. Genomics*, 292(3): 525 –533.

Tullberg BS, Merilaita S, Wiklund C, 2005. Aposematism and crypsis combined as a result of distance dependence: functional versatility of the colour pattern in the swallowtail butterfly larva. *Proc. R. Soc. B.*, 272(1570): 1315 –1321.

Wang J, Wu ZT, Li XD, 1996. Effects of host plant on the esterase activity and insecticide tolerance of *Aphis gossypii* Glover. *Entomol. Knowl.*, 33(1): 20 –22. ［王健, 吴振廷, 李学德, 1996. 寄主植物对瓜蚜酯酶活性及其耐药性的影响. 昆虫知识, 33(1): 20 –22］

Wang L, 2015. Preliminary Studies on the Host Biotypes and Formation Mechanism of Cotton Aphid in Cotton Areas of North China. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. ［王丽, 2015. 华北棉区棉蚜寄主专化型及其形成机制初步研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文］

Wang Y, Jiang HB, 2017. Prophenoloxidase activation and antimicrobial peptide expression induced by the recombinant microbe binding protein of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 83(1): 35 –43.

Wittkopp PJ, Carroll SB, Kopp A, 2003. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends Genet.*, 19(9): 495 –504.

Wittkopp PJ, Stewart EE, Arnold LL, Neidert AH, Haerum BK, Thompson EM, Akhras S, Smith-Winberry G, Shefner L, 2009. Intraspecific polymorphism to interspecific divergence: genetics of pigmentation in *Drosophila*. *Science*, 326(5952): 540 –544.

Yamaguchi J, Banno Y, Mita K, Yamamoto K, Ando T, Fujiwara H, 2013. Periodic *Wnt*1 expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. *Nat. Commun.*, 4(5): 1857 –1868.

Yang ML, Wang YL, Liu Q, Liu ZK, Jiang F, Wang HM, Guo XJ, Zhang JZ, Kang L, 2019. A β-carotene-binding protein carrying a red pigment regulates body-color transition between green and black in locusts. *eLife*, 8: e41362.

Yoda S, 2015. The transcription factor Apontic-like controls diverse coloration pattern in caterpillars. *Nat. Commun.*, 5(8): 45936 –45945.

Zhan S, Guo QH, Li MH, Li MW, Li JY, Miao XX, Huang YP, 2010. Disruption of an N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation. *Development*, 137(23): 4083 –4090.

Zhang ZJ, Zhang SS, Niu BL, Ji DF, Liu XJ, Li MW, Bai H, Palli SR, Wang CZ, Tan AJ, 2019. A determining factor for insect feeding preference in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Biol.*, 17(2): e3000162.

Zhou JW, Xu QP, Yao J, Yu SM, Cao SZ, 2015. CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in site-directed genome modification of animals. *Hereditas (Beijing)*, 37(10): 1011 –1020. ［周金伟, 徐绮嫔, 姚婧, 余树民, 曹随忠, 2015. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术及其在动物基因组定点修饰中的应用. 遗传, 37(10): 1011 –1020］

（责任编辑：赵利辉）